



#15
CD

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In Re application of:

Examiner: Einsmann, J.C.

HIROCHIKA *et al*

Group Art Unit: 1634

Serial No.: 09/721,114

Confirmation No.: 2997

Filing Date: November 22, 2000

For: A NOVEL GENE INVOLVED IN BRASSINOSTEROID RESPONSES

1500/2500

2007-08-01

THE
CITY
OF
NEW
YORK

DECLARATION UNDER 37 CFR §1.131

Date: December 12, 2002

Assistant Commissioner for Patents

Washington, DC 20231

Dear Sir:

1. We, Hirohiko HIROCHIKA, Muneeo YAMAZAKI, and Akio MIYAO, have postal addresses found next to our signatures hereinbelow.
2. We are the inventors of the above-referenced patent application.
3. At the 22nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, we presented the results of our findings on characterization of a rice stripe mutant induced by insertion of retrotransposon Tos17. The abstract of our presentation was published in the Proceedings thereof on November 22, 1999. The original abstract is attached as

exhibit 1. An English translation thereof is attached as exhibit 2.

4. Osamu UENO listed as an author of the abstract is not an inventor of the above-referenced application.

5. The abstract reports that the retrotransposon Tos17 was used to produce mutant rice strains. So-called leaf stripe mutants produced thereby lacked chlorophyll in a stripe pattern, had reduced growth, and abnormalities in glumes. Linkage analysis confirmed that this phenotype was caused by insertion of Tos17.


6. The Tos17 flanking sequences were used as probes to identify the genetic structure of the insertion region. An ORF of 1057 amino acids was identified. This ORF is encoded by the novel gene of the above-referenced application.

7. Therefore, as evidenced by exhibits 1 and 2, we were in possession of the invention of the above-referenced application prior to November 22, 1999.

We further declare that all statements made herein of our own knowledge are true and all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false


statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Executed on November 18, 2002

 Hirohiko Hirochika

Hirohiko HIROCHIKA

Address: c/o NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES
2-1-2, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8602 Japan

 Munee Yamazaki

Munee YAMAZAKI

Address: c/o NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES
2-1-2, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8602 Japan

 Akio Miyao

Akio MIYAO

Address: c/o NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES
2-1-2, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8602 Japan

第22回 日本分子生物学会年会

プログラム・講演要旨集

会 期：平成11年12月7日(火)～10日(金)
会 場：福岡ドーム、シーホークホテル&リゾート、
福岡 SRP センターホール、国立病院九州医療センター

第22回年会の開催にあたって	i
日 程 表	ii
年会参加者へのお知らせ	iv
会場までのご案内	vi
市内交通図/シャトルバス	vii
会場一覧表	viii
会場案内図	ix
シンポジウム日程と世話人/座長一覧	xii
ワークショップ日程表と世話人/座長一覧	xiii
ポスター発表日程表	xiv
年会組織委員会委員名簿	xv
年会プログラム	1
シンポジウム要旨	189
ワークショップ要旨	203
ポスター発表要旨	273
バイオテクノロジーセミナー要旨	767
市民公開講演会	783
人名索引	785
賛助会員・賛助社芳名	815
機器・試薬・書籍等展示会出品会社一覧	818
広 告	819

編集・発行 平成11年11月22日

第22回 日本分子生物学会年会組織委員会

九州大学大学院医学系研究科分子生命科学系専攻

(連絡先) (財)学会センター関西 内

〒560-0082 豊中市新千里東町1-4-2

千里ライフサイエンスセンタービル14階

電話(06)6873-2301(代) FAX(06)6873-2300

- 2P-0031 ゲノム解析に基づく 1p36 のがん関連遺伝子の単離・解析 *堀井 明¹, 林 泰秀², 稲澤義治³, 中川原章⁴, 添田栄一⁵ (¹東北大・医・分子病理, ²東大・医・小児, ³東京医歯大・難治研・分子細胞遺伝, ⁴千葉県がんセ・生化, ⁵理研・筑波セ・ジーンバンク)
- 2P-0032 大腸菌人工染色体 (BAC) の整列化と大規模マッピング *陳 迎章¹, 高岡英一郎¹, 林 泰秀², 前川耕平¹, 西村行進³, 添田栄一⁴ (¹理研・筑波セ・ジーンバンク, ²東大・医・小児科, ³東邦大・理・分子生物)
- 2P-0033 DH 法を用いたヒト BAC クローンの高速スクリーニングとマイクロアレイの作成 *清水信義, 養島伸生, 浅川修一 (慶應大・医・分子生物)
- 2P-0034 ヒトゲノム解析計画は「ラフ・ドラフト」で終了するか? 添田栄一 (理研・ジーンバンク)
- 2P-0035 機能モジュールの「組み合わせ」によるゲノム多様性の分子機構 *溝渕 潔, 斎藤裕弘, 鈴木卓司, 三瓶敏一 (電通大・量子物質)
- (1b. ゲノム, ゲノム機能) -----
- 2P-0036 系統的な大腸菌全遺伝子の破壊株の作製 *三木健良^{1,6}, 山本義弘^{2,6}, 松田秀雄^{3,6}, 堀内 嵩^{4,6}, 森 浩禎^{5,6} (¹九大・院薬, ²兵庫医大, ³阪大・院基礎工, ⁴基生研, ⁵奈良先端大, ⁶科技団・CREST)
- 2P-0037 大腸菌の欠失株分離の新方法 *井口八郎, 毛利佳雄, 後藤史門, 山室雅一, 官上真子, 中野宏昭 (京大・院理・生物物理)
- 2P-0038 出芽酵母における全プロテインホスファターゼ二重遺伝子破壊株の構築と網羅的表現型解析 ... *松岡逸美, 菊地浩二, 作本直子, 向由起夫, 小川暢男, 金子嘉信, 原島 俊 (阪大・院工・応用生物工)
- 2P-0039 NEXTDB: 線虫 *C. elegans* ゲノムの発現/機能データベース *新井 理, 本橋智子, 大庭登紀江, 杉浦郁子, 小原真澄, 北山小百合, 鈴木孝美, 長岡圭美, 廣野啓子, 上杉裕子, 佐野正子, 杉山康子, 野本久代, Jean Thierry-Mieg, Danielle Thierry-Mieg, 伊藤将弘, 小原雄治 (科技団・CREST, 国立遺伝研・遺伝資源情報セ)
- 2P-0040 線虫 *C. elegans* 母性遺伝子の RNAi による系統的機能解析と抗体による発現パターン解析 ... *廣野啓子, 長岡圭美, 岩田未菜, 大浪修一, 小原雄治 (国立遺伝研・遺伝資源情報セ, 科技団・CREST)
- 2P-0041 ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 ゲノム上の全遺伝子を破壊する系の確立 *福澤秀哉, 松井保公, 金子貴一*, 田畑哲之* (京大・院生命科学, *かずさ DNA 研)
- 2P-0042 シロイヌナズナの Functional Genomics—全遺伝子が破壊されたタグラインの作出にむけて— *加藤友彦, 佐藤修正, 田畑哲之 (かずさ DNA 研)
- 2P-0043 SAGE 法を用いたイネ幼植物体における遺伝子発現のプロファイリング *松村英生, 寺内良平 (岩手生物工研セ)
- 2P-0044 Gene trap 法によるイネ組織特異的遺伝子の単離と解析 *加藤恵美, 経塚淳子, 島本 功 (奈良先端大・バイオ)
- 2P-0045 イネレトロトランスポゾン *Tos17* を用いた部位特異的遺伝子破壊 廣近 玲, 小島直子*, 渡辺恒暁, 宮尾安藝雄, *廣近洋彦 (農水省・農生資研, *STAFF 研)
- 2P-0046 レトロトランスポゾン *Tos17* による遺伝子破壊を利用したイネ MAP キナーゼの機能解析 *渡辺恒暁, 廣近 玲, 杉本和彦, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦 (農水省・農生資研)
- 2P-0047 イネミュータントパネルの作出と解析 ... *宮尾安藝雄, 村田和優*, 田中克幸*, 小野里桂*, 篠塚より子*, 宮崎 愛, 山下優美子*, 佐々木卓治, 廣近洋彦 (農水省・農生資研・ゲノム動態, *STAFF 研)
- 2P-0048 イネレトロトランスポゾン *Tos17* の挿入によって病徴様変異を生じた系統の解析 *田中克幸, 宮尾安藝雄*, 村田和優, 小野里桂, 佐々木卓治*, 廣近洋彦* (STAFF, *農水省・農生資研)
- 2P-0049 イネレトロトランスポゾン *Tos17* の転移により得られた stripe 変異体の解析 *山崎宗郎, 上野 修, 廣近洋彦 (農水省・農生資研)
- 2P-0050 レトロトランスポゾン *Tos17* の挿入によって得られたイネ突然変異体, ring finger mutant の解析 *阿部清美, 路 鉄剛, 杉本和彦, 廣近洋彦 (農水省・農生資研・ゲノム動態)
- 2P-0051 レトロトランスポゾン *Tos17* タッキングによるイネ小粒遺伝子のクローニング *梁 正偉, 矢頭 治, 田村泰章, 青木秀之, 芦川育夫, Qingyu Wang, 廣近洋彦*, 黒田 秧 (農水省・北陸農試, *同・農生資研)

2P-0049

イネレトロトランスポゾン *Tos17* の転移により得られた *stripe* 変異体の解析
○山崎 宗郎、上野 輝、廣近 洋彦 (農水省生物研)

Characterization of a rice *stripe* mutant induced by insertion of retrotransposon *Tos17*
○Munee YAMAZAKI, Osamu UENO, Hirohiko HIROCHIKA (NIAR, MAFF)

演者は培養により特異的に活性化されるレトロトランスポゾン *Tos17* を用いて、イネゲノム中の全ての遺伝子を網羅した挿入変異系統群の作出を目指している。変異系統群は表現型変異からトランスポゾンタギングによる遺伝子単離を行う遺伝学的手法並びに挿入された遺伝子から変異形質を予想して表現型の解析を行う逆遺伝学的手法により解析される。

本大会ではイネ再分化系統群より見いだされた *stripe* 変異体の解析について報告する。得られた変異体は特に幼苗期に葉が縦線状に葉緑素を欠き、野生型に比して生育阻害が認められた。また、葉の紋や形態にも異常が認められた。電顕による観察から、葉緑素の欠失はプロプラスチドから葉緑体への分化が阻害されているためであることが明らかとなった。変異系統群 200 個体の表現型及び転移した *Tos17* の位置解析を行ったところ、表現型と転移した *Tos17* の遺伝子型との間に分離が観察されなかったことから、*stripe* 変異は *Tos17* の挿入変異である可能性が高かった。転移した *Tos17* の隣接配列をプローブとし、ゲノミックスクローニング及び cDNA クローニングを単離し、挿入領域の構造解析を行った。この領域は約 6 kb の遺伝子領域であり、4.3 kb の転写領域には 1057 アミノ酸残基に相当する、既知の遺伝子と同一性を持たない ORF の存在が示唆された。変異体ではこの遺伝子の第 5 エクソンに *Tos17* が挿入され、5' LTR で転写が中断されていた。この遺伝子領域に *Tos17* が転移した新たな系統をスクリーニングし、表現型を解析するとともに、相補性検定を進行中である。

2P-0050

レトロトランスポゾン *Tos17* の挿入によって得られたイネ突然変異体、ring finger mutant の解析

○阿部清美、路鉄剛、杉本和彦、廣近洋彦 (農業生物資源研・ゲノム動態)

Characterization of a ring finger mutant caused by insertion of retrotransposon *Tos17*
○Kiyomi ABE, Tetsuhiro KUCHI, Kazuhiko SUGIMOTO, Hirohiko HIROCHIKA (Lab. of Genome Function, NIAR)

我々は、以前に、培養によってレトロトランスポゾン *Tos17* の転移を誘発したイネの再分化植物系統 (ミュータントパネル) の中から、ring finger モチーフをもつ新規遺伝子 (OSRING1) の破壊系統 (ring finger mutant) を同定した。これまでの形態学的および生理学的解析の結果、ring finger mutant は、側根の著しい伸長抑制とともに、暗黒条件下では幼葉の伸長促進が観察されることや、この変異体にエチレンの作用阻害剤である AgNO₃ を処理した場合、側根の伸長抑制が解除されるとともに幼葉の伸長が抑制され、表現型が回復することがわかっており、その表現型にはエチレンが関与している可能性が示唆されてきた。そこで、本研究では、ring finger mutant のエチレン生成量を測定し、正常個体と比較した。その結果、地上部におけるエチレン生成量は正常個体とほとんど差がなかったが、根におけるエチレン生成量は、正常個体より多かった。このような結果から、OSRING1 はエチレンの生合成に関与していると考えられる。現在、エチレンの生合成系と OSRING1 との関係について解析中である。

2P-0051

レトロトランスポゾン *Tos17* タギングによるイネ小粒遺伝子のクローニング
○梁 正偉、矢頭 治、田村泰幸、青木秀之、戸川育夫、Wang Qingyu、廣近洋彦、黒田 鉄 (北陸農試・生物研)

Cloning of a rice small grain gene by transposon tagging with *Tos17*
○Zheng-Wei LIANG, Osamu YATOU, Yasuaki TAMURA, Hideyuki AOKI, Ikuo ASHIKAWA, Qingyu WANG, Hirohiko HIROCHIKA, Shigeru KURODA (Hokuriku Natl. Agr. Exp. Stn., Natl. Inst. Agrobiol. Res.)

これまでにイネレトロトランスポゾン *Tos17* が活性化されたイネ品種「あきたこまち」の変異集団 (約 380 系統) を供試し、形態形質及び玄米形質 (粒長、粒重、粒厚、粒色など) について突然変異を調査した。選抜した約 100 の変異系統のうち 38 系統について *Tos17* をプローブとしたゲノミックスクローニング分析を行った結果、7 系統で変異形質が *Tos17* による遺伝子破壊に起因していた。本研究では、このうちの小粒系統 A 278 の小粒遺伝子をクローニングした。突然変異系統 A 278 の玄米はやみ小粒で、その千粒重は野生型の約 85% である。 *Tos17* の挿入部位に対して TAIL-PCR を行い、 *Tos17* の挿入部位近傍の DNA 塩基配列を決定した。この DNA 塩基配列をプローブとして cDNA をクローニングした。この cDNA クローンはイネゲノムに 1 コピーのみ存在している。生物研・STAFF・イネゲノム研究チームのイネ EST に対して BLASTN で類似性検索を行った結果、この DNA 塩基配列は既知のイネ遺伝子と同一性がなかった。この cDNA クローンに対応するゲノミックスクローニングすると共に遺伝子の転写レベルでの機能や発現を調べた。

2P-0052

酵母 2 番染色体に 2 個存在する *ATP3* 遺伝子の機能と構造的差異

○大西 克典、國弘 昌之、平崎 恵市、竹田 真敏 (熊本工大・工・応生)
Functional and Structural difference of two *ATP3* genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
○K. Ohnishi, M. Kunihiro, H. Keiichi, M. Takeda (Kumamoto Inst. Tech., Applied Microbial Technology)

我々は、酵母 *S. cerevisiae* F₂ *ATP* 合成酵素サブユニットの分子集合と機能発現を解析する目的で研究を進めている。脂質部位 F₂ を構成する α、β、γ のサブユニットは生物種を問わず 3:3:1 である。α 及び β サブユニット遺伝子 *ATP1*, *ATP2* は 2 番染色体左端及び 10 番染色体右端にそれぞれ 3 コピー繰り返し存在していることに加えて、昨年本大会で、γ サブユニット遺伝子 *ATP3* も 2 番染色体右端に 2 コピー存在していることを報告した。今回これら 2 コピーの *ATP3* (*ATP3a*, *ATP3b*) の機能と構造について解析した結果を報告する。

ATP3a, *b* の遺伝子破壊実験を行ったところ、*ATP3a* 破壊株は呼吸可能であったが、グリセロール増殖での生育が遅れた (Doubling time 246 min → 336 min)。一方、*ATP3b* 破壊株は呼吸不可能に加え α⁻ となり、更に両遺伝子を破壊すると α⁻ となる現象が観察され、現在解析を進めている。両遺伝子の塩基配列を調べた結果、*ATP3a* は 308 番目のコドン (TCC) から TTC に置換されている他は *ATP3b* と全く同じであった。またその遺伝子間の距離は、18 kb あることがわかった。それぞれの遺伝子はグルコース増殖上で転写されていたが、*ATP3a* の発現は極めて弱く、その遺伝子産物である *Alp3ap* はウエスタン解析によりミトコンドリア内において検出されなかった。

現在両遺伝子の発現量により呼吸調節がどのように制御されているか又は発現タンパク質の機能が異なるかについてプロモーター領域を比較し、発現調節機構及び機能の差異について解析している。

2P-0053

Helicobacter pylori vacA 遺伝子の解析

○星野文則¹、片山和彦²、渡辺一宏³、高橋信一³、安藤崇男¹ (ピーエムエル・研究開発、²杏林大・三内)

Analysis of *Helicobacter pylori vacA* gene
○Fuminori HOSHINO¹, Kazuhiko KATAYAMA¹, Kazuhiro WATANABE¹, Shin-ichi TAKAHASHI², Takao ANDO³ (Basic Research Div. BML, Inc., Third Dept. Int. Med., Kyorin Univ. School of Med.)

Helicobacter pylori (*Hp*) の分泌する *vacA* タンパク質は *HeLa* 細胞を空胞化し、実験動物の胃粘膜細胞にも傷害を起こすことから、消化器潰瘍や胃がんなどの発症に関与する一原因因子と考えられている。*vacA* 遺伝子はすべての *Hp* が保有しているにもかかわらず、*HeLa* 細胞に対する空胞化活性は約 50% の *Hp* にしか認められない。我々は、空胞化活性を測定し得た *Hp* の *vacA* 遺伝子全長の塩基配列を決定し、遺伝子の heterogeneity と活性との関係を解析した。ヒトの胃より分離した *Hp* 株の空胞化活性を *HeLa* 細胞を用いて測定し、活性型 5 株、不活性型 5 株を得た。これらの株より抽出精製したゲノム DNA を template とし、*vacA* の ORF 外側に設計したプライマーセットによる PCR を施行し、*vacA* 遺伝子 (約 4 kb) の amplicon を得た。amplicon の塩基配列は primer walking 法により direct sequence によって決定した。活性型 5 株はすべて、*vacA* ORF のフレームが通っていたが、不活性型 5 株のうち 3 株は ORF の frame shift や deletion により、ORF 内に stop codon が出現していた。しかし、残る不活性型 2 株と、活性型との間には特筆すべき *vacA* 遺伝子配列の差は認められなかった。以上のことから *Hp* は *vacA* 遺伝子の変異により、正常な *vacA* 蛋白質の産生ができなくなり、空胞化活性を失った株が存在することが明らかになった。しかし、そのような変異の無い不活性型 *Hp* 株も存在することから、*vacA* 遺伝子のプロモーター領域、*vacA* 分泌に関与する他の遺伝子群が空胞化活性に関与している可能性がある。

2P-0054

腸管出血性大腸菌 O157 志賀毒素産生遺伝子とその下流域の DNA 塩基配列の検討

・宮原美知子、小沼博隆 (国立衛研)

Studies on DNA Sequences of Shiga Toxin 2 producing Gene and the Downstream

・Michiko MIYAHARA and Hirohiko KONUMA (Natl. Inst. Health Sci.)

1996 年に大流行となり社会を混乱に陥らせた腸管出血性大腸菌の DNA 塩基配列を検討した。志賀毒素産生遺伝子 (*stx2*) の一部と引き続いて下流域について検討を行った。用いた菌株は日本で流行した臨床株 12 株で、すべて *Stx2* を産生していた。

各菌株から熱抽出により DNA を採取した。PCR と cycle sequencing により塩基配列を検討した。GENETYX-MAC により解析を行った。アメリカのウィスコンシン大学でゲノム解析が行われている腸管出血性大腸菌 O157:H7 EDL933 株の temperate bacteriophage B933W との関連領域での配列比較を行った。その結果、日本で流行した臨床株 O157 の 12 株がすべて B933W とほぼ同じ *stx2* 配列 (検討したのは後半部分) とその下流域 (約 500 bp) を有していることがわかった。下流域の配列はホモロジー解析の結果では大腸菌 K12 株の一部と類似していることから、bacteriophage 933W は大腸菌ゲノムから部巻き込んだ配列を有していることがわかった。これらのことから、1982 年アメリカで流行した腸管出血性大腸菌 O157:H7 に関わる bacteriophage 933W が、日本での 1990 年代後半での流行株においても、*stx2* 配列はカリフォルニア下流域の不必要と思われる配列部分においてもそのまま見られることから、bacteriophage を介した大腸菌であると推測される。

(Translation)

Program and Proceeding of 22th Annual Meeting of the
Molecular Biology Society of Japan (published on November 22,
1999)

[P. 108]

2P-0049

Characterization of a rice stripe mutant induced by
insertion of retrotransposon Tos17

Muneo YAMAZAKI, Osamu UENO, Hirohiko HIROCHIKA (NIAR, MAFF)

[P. 528]

2P-0049

Characterization of a rice stripe mutant induced by
insertion of retrotransposon Tos17

Muneo YAMAZAKI, Osamu UENO, Hirohiko HIROCHIKA (NIAR, MAFF)

We are aiming to produce insertion mutant strains which encompass all genes of a rice genome by using retrotransposon Tos17 which is specifically activated by culture. Such insertion mutant strains are analyzed by a genetically engineering method for isolating a gene from a phenotype mutant by transposon tagging, and a reverse genetics method for analyzing a phenotype by predicting a mutated trait from an inserted gene.

In this meeting, we will report analysis of stripe mutants found from redifferentiated rice strains. It was observed that the leaf of such mutants lacked chlorophyll in a pattern of stripes, especially when it was at the stage of shoot, and the growth of the mutants was inhibited. Abnormality was also observed in the number of glumes and the morphology of glume. Electron microscope observation

revealed that prevention of proplastid from being differentiated into chlorophyll was responsible for the deletion of chlorophyll. Linkage analysis was conducted between the phenotypes of about 200 mutant strains and transposed Tos17. As a result, no separation was found between the phenotype and the transposed Tos17. Therefore, it was highly probable that the stripe mutation was caused by insertion of Tos17. The flanking sequences of transposed Tos17 were used as probes to isolate genomic clones and cDNA clones for the purpose of structural analysis of the insertion region. As a result, it was suggested that such a region is a gene region of about 6 kbs and the 4.3-kb transcription region thereof has an ORF corresponding to 1057 amino acid residues and having no homology to existing genes. In the mutant, Tos17 was inserted into the fifth exon of this gene and transcription was discontinued in the 5'LTR. We are now conducting screening for new strains in which Tos17 is transposed in the gene region and analyzing phenotypes thereof, together with complementation tests.